

Projectnummer 101 6040

Niveaucontrole op het kwaliteitsonderzoek van boerderijmelk ten behoeve van het Centraal Orgaan voor Melkhygiene.

Projectleider: ing. A.E.M. Vermunt

Rapport 90.11                      maart 1990

Onderzoek naar de bruikbaarheid van  
controlemonsters ten behoeve van de  
bepaling van boterzuurbacterien in  
boerderijmelk.

N.J.G. Broex, G.J.M. Loeffen en  
M. van Smaalen

Afdeling Microbiologie

Goedgekeurd: drs J.M.P. den Hartog

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)  
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen  
Postbus 230, 6700 AE Wageningen  
Telefoon 08370-19110  
Telex 75180 RIKIL  
Telefax 08370-17717

Copyright 1990, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouw-  
produkten.

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermel-  
ding.

VERZENDLIJST:

INTERN:

directeur  
sectorhoofden  
produktcoördinator dierlijke produkten  
afdeling Microbiologie (6x)  
programmabeheer en informatieverzorging  
circulatie  
bibliotheek

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek  
Directie Wetenschap en Technologie  
Directie Veehouderij en Zuivel (ir J.J. Bakker)  
Centraal Orgaan voor Melkhygiene (ing. W.H.J. Bakker)  
Nederlands Instituut voor Zuivel Onderzoek (NIZO)  
Commissie van advies van het Centraal Orgaan voor Melkhygiene  
(dr ir J.J. Stadhouders)  
Melkcontrolestation Noord  
Melkcontrolestation Oost  
Coöperatieve Vereniging voor Melkonderzoek Zuid Nederland  
Melkcontrolestation West  
Regionaal Orgaan voor Melkhygiene Noord  
Regionaal Orgaan voor Melkhygiene Oost  
Regionaal Orgaan voor Melkhygiene Zuid  
Regionaal Orgaan voor Melkhygiene West

INHOUD	Blz.
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	4
2 MATERIALEN	4
2.1 Kuilvoersuspensie	4
2.2 Steriele magere melk	4
2.3 Monsters	4
3 METHODEN	5
4 RESULTATEN EN DISCUSSIE	5
4.1 M.P.N.	5
4.2 Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid	6
5 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	6
BIJLAGEN 1 t/m 8	



## SAMENVATTING

In dit onderzoek is nagegaan of met behulp van een kuilvoersuspensie met een hoog gehalte aan boterzuurbacteriën, melkmonsters te maken zijn die gebruikt kunnen worden bij de in- en externe kwaliteitscontrole. Aan steriele magere melk zijn verschillende concentraties kuilvoersuspensie toegevoegd. Na homogeniseren zijn hoeveelheden van 50 ml afgevuld en 5 maal, onder steeds andere codes, naar de deelnemende laboratoria verstuurd. Aan de hand van de gehalten sporen per ml, berekend via de meest waarschijnlijke aantallen, is de herhaal- en de reproduceerbaarheid berekend met het statistisch programma "ISO 5725". Uit dit onderzoek blijkt dat het op deze manier mogelijk is referentiemateriaal te bereiden voor de bepaling van het aantal sporen van boterzuurbacteriën, in rauwe melk.

## 1 INLEIDING

Ten behoeve van de kwaliteitsparameter "boterzuurbacteriën in boerderijmelk" dient een kwaliteitsborgingsprogramma te worden ontwikkeld. Probleem is echter dat geen geschikt referentiemateriaal beschikbaar is. Een oplossing ligt mogelijk in het gebruik van rauwe melk met een hoog gehalte aan sporen van boterzuurbacteriën. Indien dergelijke melk beschikbaar zou zijn, zijn monsters te maken die van dienst kunnen zijn bij de in- en externe kwaliteitscontrole. Met behulp van centraal gemaakte monsters kunnen gegevens verkregen worden omtrent herhaalbaarheid (interne controle) en reproduceerbaarheid (externe controle).

## 2 MATERIALEN

### 2.1 Kuilvoersuspensie

Van het NIZO is een kuilvoersuspensie betrokken met ca.  $2 \times 10^6$  sporen boterzuurbacteriën per ml. Deze suspensie wordt bij ca.  $-40^{\circ}\text{C}$  bewaard. Vlak voor het mengen met steriele magere melk wordt de benodigde hoeveelheid suspensie ontdooid.

### 2.2 Steriele magere melk

In de handel verkrijgbare magere UHT melk, vrij van boterzuurbacteriën.

### 2.3 Monsters

Van de oorspronkelijke kuilvoersuspensie (2.1) wordt 1 ml zodanig verdund met steriele magere melk (2.2) dat porties melk verkregen worden met een verwacht aantal sporen van resp. 5, 10, 15 en 20 per ml. Na zorgvuldig homogeniseren van de aldus verkregen oplossingen worden deze aseptisch afgevuld in porties van elk 50 ml en onmiddellijk ingevroren bij  $-20^{\circ}\text{C}$ . Vier duplomonsers werden 5 maal, onder steeds verschillende codes, diepgevroren en met koelelement naar de vier melkcontrolestations gestuurd. Tevens werden de monsters door twee personen, onafhankelijk van elkaar, op het RIKILT onderzocht (bijlage 8).

### 3 METHODE

De onderzoeksmethode zoals voorgeschreven in de "reglementen bundel" van de stichting "Centraal Orgaan voor Melkhygiëne" is toegepast waarbij bij de bereiding van de melk-glucose-melkzuuroplossing steeds gebruik is gemaakt van magere UHT melk.

Voor de bepaling van het meest waarschijnlijke aantal (M.P.N.) sporen boterzuurbacteriën per ml melk werd elk monster steeds ingezet volgens onderstaand schema:

5 x 1,0 ml

10 x 0,5 ml

10 x 0,1 ml

10 x 0,05 ml

Gasvorming onder de paraffineprop, na de voorgeschreven incubatietijd, werd als positief opgegeven.

### 4 RESULTATEN EN DISCUSSIE

#### 4.1 M.P.N.

Het onderzoek werd verricht in week 13 t/m 17 1988. In bijlage 1 t/m 4 zijn de resultaten weergegeven van het aantal sporen boterzuurbacteriën per ml van de duplomonsters met de nummers 1-2, 3-4, 5-6 en 7-8. Uit de resultaten blijkt dat het M.P.N.-getal van de duplo's geen significante verschillen oplevert. Onderstaande tabel geeft de resultaten weer van het M.P.N.-getal van de duplo-gemiddelden berekend volgens het geometrisch gemiddelde.

monster	M.P.N.-getal
1 en 2	2,49
3 en 4	4,31
5 en 6	5,88
7 en 8	7,60

Het M.P.N.-getal is lager dan het gedoseerde aantal sporen, dit wordt veroorzaakt doordat de stamoplossing (kuilvoersuspensie) minder sporen bevatte dan oorspronkelijk verwacht was.



#### 4.2 Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid

In bijlage 5 (tabel), 6 en 7 (histogrammen) is de herhaal- en reproduceerbaarheid weergegeven per week, per duplo in % van week 13 t/m 17. Deze zijn berekend met het statistisch programma "ISO 5725" (logaritmisch) waarna inverse log wordt toegepast  $-1 \times 100\%$  bijvoorbeeld ISO 5725.

Herhaalbaarheid (r) 0,281

Reproduceerbaarheid (R) 0,335.

$$r = (10^{0,281} - 1) \times 100\% = 91,0\%$$

$$R = (10^{0,335} - 1) \times 100\% = 166,3\%$$

De gemiddelde herhaalbaarheid is 138%. De gemiddelde reproduceerbaarheid is 246 %. De herhaal- en reproduceerbaarheid is hoog.

#### 5 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

Kuilvoersuspensie is goed bruikbaar voor interlaboratoriumonderzoek en is, mits bewaard bij ca.  $-40^{\circ}\text{C}$ , tenminste 2 jaar houdbaar.

Standaardiseren is via deze methode mogelijk.

Er moet onderzoek verricht worden om de herhaal- en reproduceerbaarheid te verlagen. Mogelijke onderzoekspunten zijn;

- Kuilvoersuspensie mengen met steriel water, 1 uur schudden en dan doorverdunnen met magere UHT melk tot de gewenste concentratie sporen per ml.
- Het afsluiten van de buizen met agar i.p.v. paraffine, waardoor een duidelijker beeld ontstaat van aan- of afwezigheid van boterzuurbacteriën.



# BIJLAGE 1

M.P.N.-getal van het aantal sporen boterzuurbacteriën per ml van monster 1 en 2, week 13 t/m 17 1988. Gemiddelden berekend op geometrische wijze.

---

## monster 1

laboratorium	1	2	3	4	5	6	gem.
week							
13	1.95	2.26	1.85	1.61	1.96	3.36	2.10
14	2.77	2.50	1.66	2.04	2.05	2.15	2.17
15	3.60	-	2.26	1.37	3.98	2.95	2.65
16	1.53	2.05	3.01	3.05	2.85	2.15	2.37
17	1.85	1.92	4.40	1.51	3.25	2.05	2.32
gem	2.23	2.17	2.47	1.83	2.72	2.48	2.30

---

## monster 2

13	3.63	2.36	2.26	2.54	1.93	3.60	2.64
14	2.26	1.37	1.74	3.60	1.93	3.27	2.23
15	4.45	-	3.60	0.83	7.16	3.97	2.23
16	2.61	1.57	1.59	2.55	2.60	4.31	2.39
17	5.46	4.99	2.93	2.25	2.75	2.26	3.22
gem	3.49	2.24	2.31	2.13	2.86	3.40	2.69

---

## monster 1 & 2

gem	2.79	2.21	2.39	1.97	2.79	2.90	2.49
-----	------	------	------	------	------	------	------

---

## BIJLAGE 2

M.P.N.-getal van het aantal sporen boterzuurbacteriën per ml van monster 3 en 4, week 13 t/m 17 1988. Gemiddelden berekend op geometrische wijze.

---

### monster 3

laboratorium week	1	2	3	4	5	6	gem.
13	3.97	2.75	1.91	3.63	3.05	5.26	3.27
14	5.62	2.15	3.60	3.55	3.66	6.06	3.88
15	4.36	—	3.25	4.45	8.77	6.15	5.09
16	4.45	6.06	4.01	6.26	5.39	3.93	4.93
17	3.63	4.40	7.93	2.30	3.69	6.06	4.32
gem	4.36	3.54	3.72	3.83	4.55	5.42	4.22

---

### monster 4

13	6.15	2.95	2.74	5.31	4.87	4.36	4.22
14	6.15	2.50	3.03	3.98	3.60	10.79	4.40
15	4.40	—	4.40	1.85	8.66	2.99	3.92
16	4.99	5.62	5.26	9.09	6.84	3.25	5.57
17	3.03	6.15	7.93	2.09	2.47	6.15	4.09
gem	4.79	4.00	4.33	3.75	4.81	4.90	4.41

---

### monster 3 & 4

gem	4.57	3.76	4.01	3.79	4.68	5.15	4.31
-----	------	------	------	------	------	------	------

---

# BIJLAGE 3

M.P.N.-getal van het aantal sporen boterzuurbacteriën per ml van monster 5 en 6, week 13 t/m 17 1988. Gemiddelden berekend op geometrisch wijze.

## monster 5

laboratorium	1	2	3	4	5	6	gem.
week							
13	9.93	4.82	4.64	2.81	7.28	10.21	6.00
14	7.76	4.45	3.94	5.66	3.39	7.76	5.22
15	6.26	-	4.87	3.97	3.95	4.40	4.62
16	7.76	14.50	7.76	6.06	4.68	4.31	6.89
17	4.93	9.93	8.77	3.25	4.73	7.76	6.09
gem	7.13	7.47	5.71	4.16	4.64	6.51	5.74

## monster 6

13	7.93	5.54	3.98	4.40	8.87	11.47	6.54
14	8.30	3.25	6.15	5.46	4.40	8.11	5.64
15	4.93	-	6.06	1.60	8.66	7.46	4.99
16	8.77	6.26	6.96	5.97	6.15	4.40	6.29
17	6.96	7.93	11.47	2.31	4.73	11.87	6.59
gem	7.23	5.47	6.53	3.51	6.29	8.16	5.99

## monster 5 & 6

gem	7.18	6.39	6.10	3.82	5.40	7.29	5.88
-----	------	------	------	------	------	------	------

# BIJLAGE 4

M.P.N.-getal van het aantal sporen boterzuurbacteriën per ml van monster 7 en 8, week 13 t/m 17 1988. Gemiddelden berekend op geometrische wijze.

## monster 7

laboratorium week	1	2	3	4	5	6	gem.
13	6.84	3.94	6.26	4.83	6.26	5.90	5.58
14	17.09	8.66	15.83	4.55	3.66	6.96	8.05
15	5.39	-	6.96	2.83	5.72	8.66	5.55
16	7.76	14.58	8.56	12.90	13.39	6.96	10.26
17	7.10	5.59	23.56	4.92	12.45	25.56	10.66
gem	8.09	7.26	10.68	5.25	7.38	9.12	7.74

## monster 8

13	11.47	6.96	4.36	10.03	4.87	10.49	7.50
14	12.90	12.90	11.87	3.24	12.90	6.68	9.06
15	11.12	-	4.93	2.76	4.77	7.20	5.54
16	9.66	9.34	7.76	17.09	7.16	7.76	9.34
17	6.26	6.96	10.79	4.40	3.85	6.36	6.08
gem	9.99	8.74	7.34	5.83	6.07	7.57	7.40

## monster 7 & 8

gem	8.99	7.97	8.86	5.53	6.69	8.31	7.60
-----	------	------	------	------	------	------	------

# BIJLAGE 5

Herhaalbaarheid van boterzuur rondzending, week 13 t/m 17 1988, in %.

---

monster/duplo	1	2	3	4	gem
week					
13	91	99	72	183	111
14	116	68	64	216	116
15	120	183	231	111	161
16	150	59	107	101	104
17	254	57	81	704	199
gem					138

---

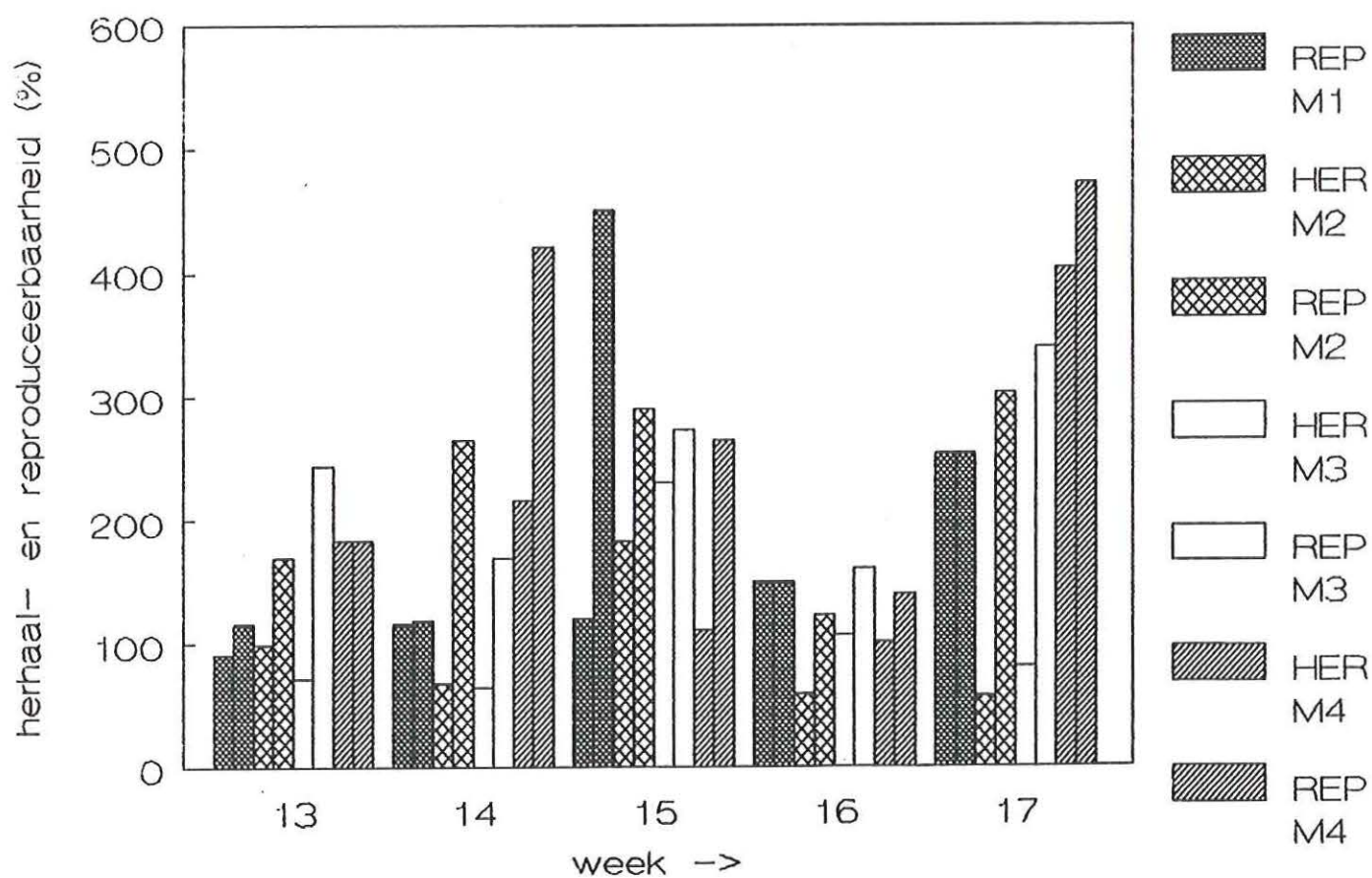
Reproduceerbaarheid van boterzuur rondzending, week 13 t/m 17 1988, in %.

---

monster/duplo	1	2	3	4	gem
week					
13	116	170	244	183	178
14	119	265	170	420	244
15	450	291	274	265	320
16	150	123	161	140	144
17	254	304	341	472	343
gem					246

---

# Herhaal- en reproduceerbaarheid boterzuur (%) week 13 t/m 17 1988



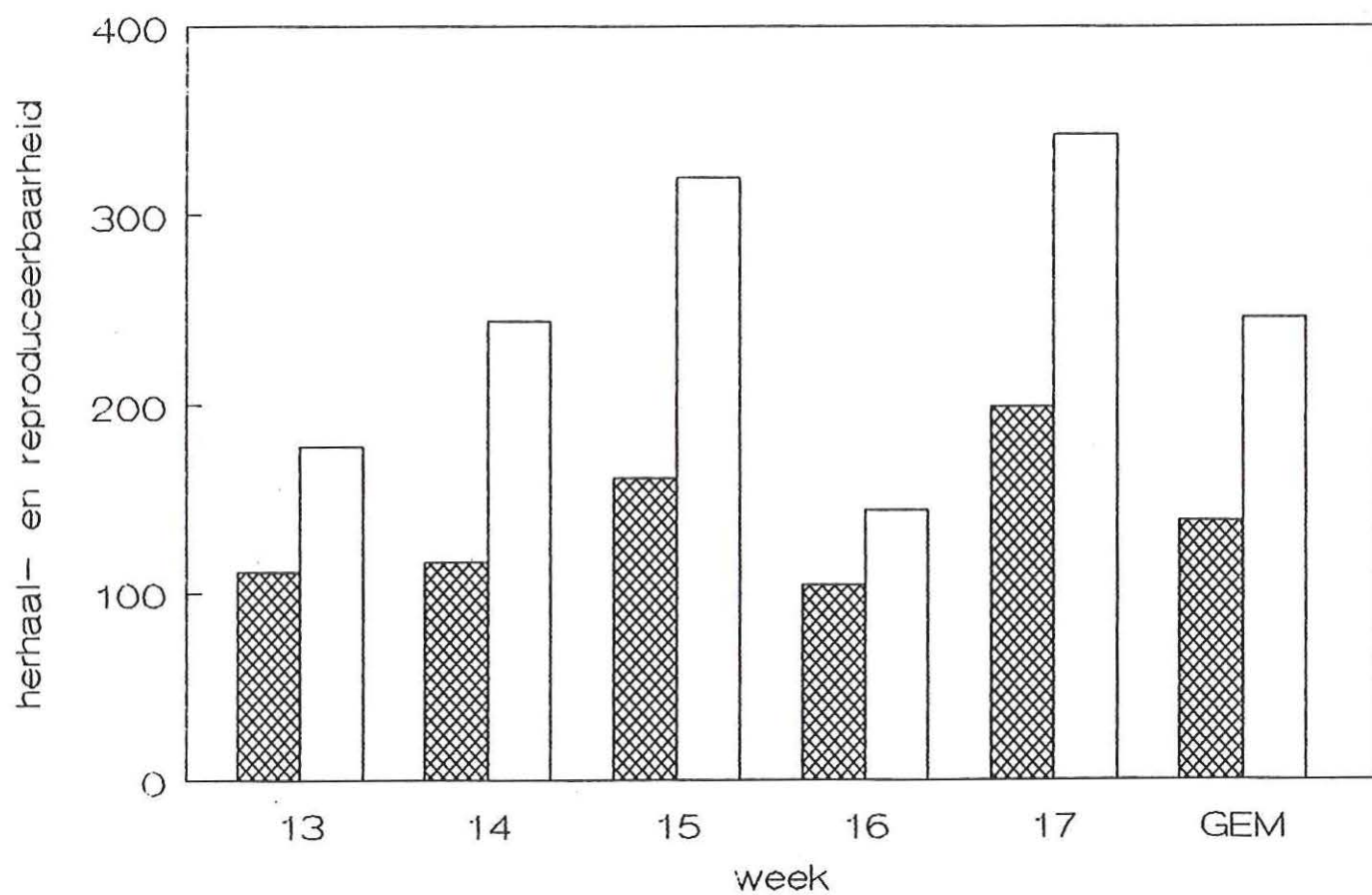


BIJLAGE 7

Gemiddelde herhaal- en reproduceer-  
baarheid boterzuur (%) week 13 t/m17 '88

HER

REP





## Onderzoekplan Referentiemonsters boterzuurbacterien.

### 1. Algemeen.

Ten behoeve van de kwaliteitsparameter "boterzuurbacterien in boerderijmelk" dient een kwaliteitsborgingsprogramma te worden ontwikkeld. Probleem is dat hiervoor niet altijd geschikt monstermateriaal beschikbaar is, nl. melk met een laag gehalte aan boterzuurbacterien.

Indien deze melk wel beschikbaar zou zijn kunnen ringmonsters gemaakt en onderzocht worden. Momenteel is nog te weinig bekend over de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van deze methode zodat interpretatie van ringmonster resultaten nagenoeg niet mogelijk is.

Met behulp van centraal gemaakte monsters moet het mogelijk zijn voldoende gegevens te verkrijgen zodat de gewenste berekeningen uitgevoerd kunnen worden.

Onderzocht wordt of met behulp van een suspensie van kuilvoer, dat een hoog gehalte aan boterzuurbacterien bevat, en steriele magere melk, deze monsters samen te stellen zijn.

### 2. Materiaal.

- kuilvoersuspensie met ca.  $2 \times 10^8$  sporen/ml
- steriele magere melk

1 ml suspensie met steriele magere melk verdunnen tot porties met resp. 0, 5, 10, 15, 20 en 25 sporen/ml verkregen worden. Deze porties verdelen in hoeveelheden van 50 ml en onmiddellijk invriezen.

Deze diepgevroren monsters worden een aantal maal, onder code, aan de vier melkcontrolestations voor onderzoek aangeboden. De melkcontrolestation en het Rikilt bepalen van elk monster het Meest Waarschijnlijk Aantal (MPN) sporen van boterzuurbacterien per ml melk.

### 3. Methode

Conform de, op melkcontrolestations, gebruikelijke methode met de opmerking dat voor de bereiding van de melk-glucose-melkzuuroplossing steeds uitgegaan wordt van steriele magere melk.

### 4. Resultaten

4.1. Aan de hand van de resultaten van de duplomonsters en/of triplomonsters, die een aantal maal onderzocht worden, kunnen herhaalbaarheidsberekeningen per M.C.S. worden uitgevoerd. Met de resultaten van MCS's en Rikilt kunnen de reproduceerbaarheidsberekeningen worden uitgevoerd.

## BIJLAGE 8b

4.2. Nadat de resultaten van 4.1. bekend zijn kunnen criteria opgesteld worden die gelden voor de interpretatie van de resultaten van ringmonsters.

Vervolgens kunnen de ringtesten ten behoeve de kwaliteitsborging worden uitgevoerd.

### 5. Tijdplanning.

Klaar maken en uittesten van het gewenste aantal proefmonsters: februari.

Onderzoek melkcontrolestations: maart en april.

Afronding van dit proefplan doormiddel van rapportage van de resultaten mei 1988.

1988-02-26

N. J. G. Broex